第32卷 第1期　　昆 虫 学 报　　Vol. 32, No. 1
1989年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1989

粘虫幼虫肠道蛋白水解酶特性的研究

白 成　　沙槎云
（中国科学院动物研究所，北京）

摘要　本文研究了粘虫（*Mythimna separata* Walker）幼虫蛋白水解原酶和粗提的幼虫肠道蛋白水解酶的一些主要生化特性。实验结果表明：幼虫肠道蛋白水解酶温培后仍然保持最大酶活的最适温度是25℃，最适pH是11，从pH和酶活关系的曲线图可知原酶在pH9和10之间有一个"峰肩"，然而粗提酶则没有。

新鲜收集的幼虫原酶在30℃下经过2小时培养后，酶的活性可以提高10%。本研究也为寻找合适的粘虫幼虫蛋白水解酶的温度处理和作用条件提供了理论依据。

关键词　粘虫幼虫　肠道蛋白水解酶

昆虫肠道含有多种酶。对鳞翅目幼虫的肠道蛋白水解酶的研究是探讨害虫营养生理和杀虫剂毒杀机理非常重要的一个方面。从多种昆虫肠液的测定结果证明，鳞翅目幼虫中肠肠液是偏碱性的，多数在pH8—10之间。作者曾经测定粘虫幼虫返吐液的pH是9.26（沙槎云等，1981）。在这一生理条件下，粘虫幼虫对摄入的蛋白质物质在蛋白水解酶的作用下进行消化、吸收和利用。

近年来国外许多学者对一些幼虫肠道蛋白酶的活性及其性质进行了研究（Ahmad等，1976; Kunz, 1978）。较早使用蛋白水解酶作用底物的是Oakely等(1946)和Kunitz(1947)，他们使用的底物是Azocoll和酪蛋白。粘虫（*Mythimna separata* Walker）是取食玉米、小麦、水稻和谷子等作物的害虫，而且大龄幼虫有一定的耐药性，所以研究了解粘虫幼虫肠道蛋白酶的特性，对于选择最佳的消化条件进行体外模拟实验，以及选择有特异性的无公害的胃毒杀虫剂，也有一定的指导意义。本文重点研究了pH、温度和温培时间对粘虫幼虫肠道蛋白酶活的影响。

材料和方法

1. 供试昆虫　粘虫幼虫在实验室内以玉米叶喂养。

2. 酶来源　粘虫幼虫肠道蛋白水解酶的收集、提取、纯化催化，以及蛋白水解酶的测定等方法同沙槎云等法(1981)，使用酪蛋白为底物测酶活。粗提幼虫肠道蛋白水解酶主要是经过温度处理和Sephadex-G75柱层析制备。

3. 实验过程

（1）分别把粘虫肠道蛋白水解酶置于0、15、20、25、30、37和50℃培养3小时，然后取样，适度稀释后测定酶活。

（2）按常规方法配制醋酸-醋酸钠、Tris-HCl和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液，将pH准

本文于1986年9月收到。

确调为 6、7、8、9、10、11 和 11.91。接着分别加入适当浓度的粘虫肠道蛋白水解酶，在室温(约23—25℃)下培养 5 小时 30 分钟，然后取样，测定酶活力。

(3) 取收集的新鲜幼虫返吐液(作为原酶)放置在 30℃ 温培箱中，培养 0、2、4、6、12、24、48 和 72 小时，然后定时取样，测定各个组分的酶活力。

4. 按照 Lowry 等(1951)的方法测定样品蛋白质含量。

结　　果

1. 温度对粘虫幼虫蛋白水解酶的影响

在实验不同温度下，培养后的粘虫幼虫蛋白水解原酶和粗提的蛋白水解酶的酶活性变化见图 1 和图 2。从图 1 可知，最大的酶活性是在 25℃ 温培后测得的。这一结果说明粘虫幼虫蛋白水解原酶经过适当时间和适当温度的培养后，酶可被激活；而低于 25℃ 的温培处理，可以保持酶原来具有的活性；但高于 25℃ 的温培处理，则导致酶的活性骤然下降(如图 1)，在 50℃ 下温培的结果，只有原来酶活的 34%。

图 2 表明粗提的粘虫幼虫蛋白水解酶在低于 25℃ 温培时，酶的活性随着温度的升高而增加。但在达到高峰值后(25℃时)，也同原酶一样，它的活性骤然下降。

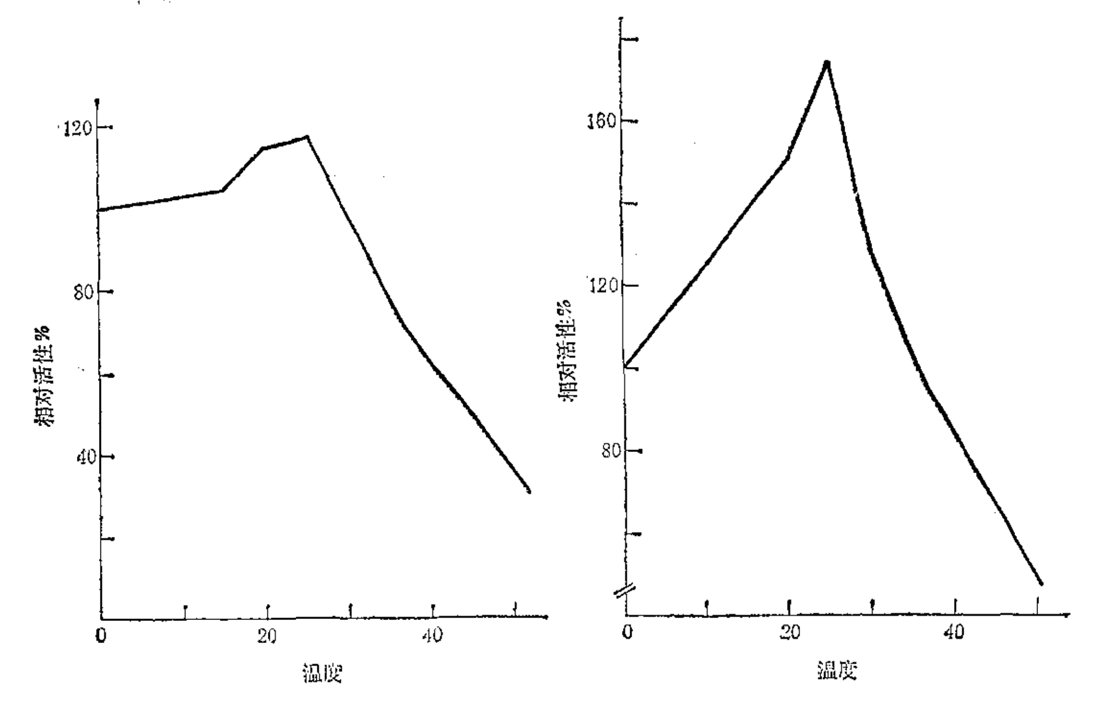


图 1　不同温度培养后对粘虫幼虫肠道蛋白水解原酶活性的影响 (℃)

图 2　不同温度培养后对粗提的粘虫幼虫肠道蛋白水解酶活性的影响 (℃)

2. pH 对粘虫幼虫肠道蛋白水解酶的效应

经不同 pH 的缓冲液温培处理后，粘虫幼虫肠道蛋白水解酶的活性见图 3 和图 4。曲线表明最适 pH 是 11。而幼虫肠道蛋白水解原酶的活性在 pH6—9 的范围内(见图 3)，酶活性是随着 pH 的升高而增加的，但在 pH9 和 10 之间，曲线上升的趋势不明显，几乎形成

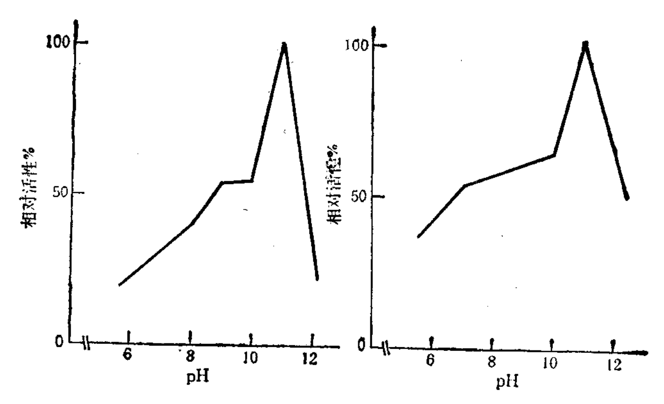


图 3 在不同 pH 的缓冲液中温培后粘虫幼虫肠道蛋白水解原酶活性变化

图 4 在不同 pH 的缓冲液中温培后粗提的粘虫幼虫肠道蛋白水解酶活性变化

一个“肩状”。当活力达到峰值后，幼虫的原酶在 pH11.91 的碱性条件下，活力曲线迅速下降。说明在这个环境中，多数酶蛋白已经变性而失去一些活力。

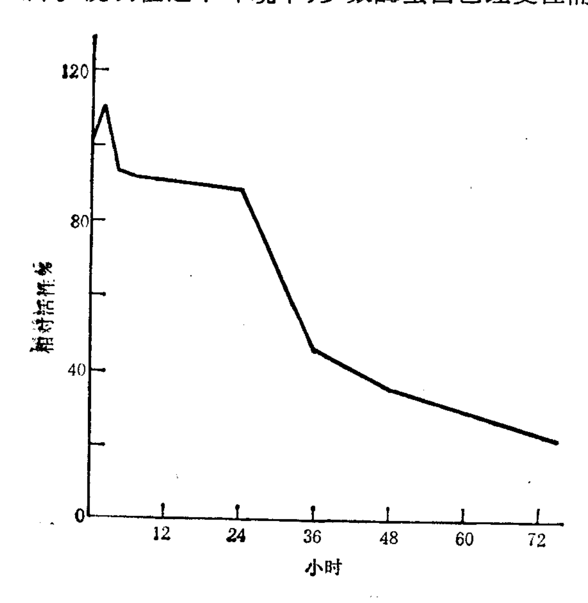


图 5 以不同时间，30℃ 条件下，温培处理后对新鲜粘虫幼虫肠道蛋白水解酶活性的影响

在与上述相同的条件下进行实验的结果表明，粗提的粘虫幼虫蛋白水解酶的活性曲线与原酶的活性曲线略有不同(见图 4)，即酶的活性从 pH6—10 一直缓慢上升，无“肩状峰”，从 pH10—11 则突然升高，然后随 pH 的增高而急剧下降。上面两个图说明了粘虫幼虫蛋白水解酶经过 pH11 的碱性缓冲液处理后，却可以提高酶活。

3. 培养时间对粘虫肠道蛋白水解酶的影响

粘虫肠道蛋白水解原酶在一定 pH 的缓冲液中培养几小时以后，酶活性的变化如图 5。引人注目的酶活性变化是：温培处理 2 小时，酶的活性增高 10%，但继续培养时，随着时间的延长酶的活性逐渐下降。然而在温培处理 24 小时后，大部分酶活性仍然保留，大约是原来的 90%；在温培 72 小时后，大部分酶失活，仅有对照原酶的 23%。

讨 论

通过粘虫肠道蛋白水解酶活性变化的测定，肯定了酶作用的最适 pH 是 11，这与家蚕 *Bombyx mori*(Eguchi & Iwamoto, 1976) 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*(Ahmad, 1976) 的测定结果相同。斜纹夜蛾蛋白水解酶活性曲线在 pH8—9 之间有一个“峰肩”，而这里用室内饲养的粘虫，其蛋白水解酶所测定的活性曲线同样有一个“峰肩”，即在 pH9—10

之间，这一微小的差异可能由于供试虫种略有差异之故。另外，这种蛋白水解酶在体外温培处理最适温度是 25℃，而这一温度恰好是普通饲养粘虫所用的温度。

蛋白水解原酶和粗提酶的热稳定性(图 3 和图 4) 表明粘虫幼虫与家蚕幼虫的酶活曲线略有不同。Eguchi 和 Iwamoto(1976) 所用的家蚕蛋白水解酶温培时间是 10 分钟，我们用的温培时间较长，所以可能由于所用的培养时间不同所致。

另外非常有趣的结果是体外 30℃ 定温培养新鲜的粘虫幼虫返吐液，原酶活力与时间关系曲线的趋势与饥饿斜纹夜蛾幼虫的肠道酶活力与时间的关系曲线的趋势类似 (Ahmad 等，1976)。 斜纹夜蛾幼虫经过饥饿 4 小时所测得的蛋白水解酶活力提高了 10%。Ahmad 等(1976)认为饥饿影响蛋白酶的活性。 在开始饥饿 4 小时以后测得的肠液蛋白浓度明显减少，这时测得的蛋白酶活性高。可是粘虫幼虫蛋白酶活力经过 2 小时体外培养也提高了 10%，只是所用的时间缩短 2 小时，这可能是把部分酶原激活形成酶的结果。随着饥饿或体外温培时间的延长，酶活则不断的下降。这种体外模拟实验也揭示了粘虫幼虫肠道蛋白酶所具有的这种特性：即蛋白酶的活性与温培处理的时间密切相关。

参　考　文　献

沙槎云、白成、温洁　1981　粘虫肠道蛋白酶在苏云金杆菌肯尼亚变种“7404”晶体致病中的作用。昆虫学报 **24**(3): 237—43。

Ahmad, Z. et al. 1976 Alkaline protease in the larvae of armyworm, *Spodoptera litura. Insect Biochem.* **6**: 501—5.

Eguchi, M. & Iwamoto, A. 1976 Alkaline proteases in the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori. Insect Biochem.* **6**: 491—6.

Kunitz, M. 1947 Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291—310.

Kunz, P. A. 1978 Resolution and properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti. Insect Biochem.* **8**: 43—51.

Lowry, O. H. et al. 1951 Protein mesurement with the Folin phenol regent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—75.

Oakley, C. L. et al. 1946 The collagenase (k-toxin) of *Cl. welchii* Type A. *J. Path. Bact.* **58**: 229—35.

A STUDY ON THE INTESTINAL PROTEASES OF *MYTHIMNA SEPARATA* LARVAE

Bai Cheng　　Sha Cha-yun

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

Investigation was made on the biochemical properties of the crude and partially purified gut proteases from the larvae of *Mythimna separata.* The results showed that the gut proteases *in vitro* could maintain their activity after incubation for different lengths of time and the maximum activity was obtained at 25°C. The optimal pH was 11, with an uneven change between pH9 and 10 for the crude proteases, which was different for the partially purified enzyme. The activity of fresh larval gut proteases increased 10% after 2 hours of incubation at 30°C. Thus, the optimal conditions for the activity of the larval gut proteases have been determined.

Key words　*Mythimna separata*——gut protease